



PCT/FR 00/01566

REC'D 14 JUL 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

09/980265

#2

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir en lettres capitales

DB 540a W/170299

| DATE DE REMISE DES PIÈCES - 6 AOUT 1999 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 9910378 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 27 DATE DE DÉPÔT - 6 AOUT 1999 | | 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE AVENTIS PASTEUR Direction de la Propriété Intellectuelle Danièle KERNEIS 58, avenue Leclerc 69007 LYON n° du pouvoir permanent : PG 04853 références du correspondant : PM 9908 téléphone : 04 37 37 70 90 n° date | | | | | | | | | |
|---|--------|---|----------------------|----------------|--------|---------------|----------------------|--|--|--|--|
| 2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° | | | | | | | | | | | |
| Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non | | | | | | | | | | | |
| Titre de l'invention (200 caractères maximum) Oligonucléotide Immunostimulant | | | | | | | | | | | |
| 3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3.4.9.5.0.5.3.7.0 Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins | | code APE-NAF 2.4.4.C S.A. Forme juridique | | | | | | | | | |
| Nationalité (s) Française | | | | | | | | | | | |
| Adresse (s) complète (s) 58, avenue Leclerc 69007 LYON | | Pays FRANCE | | | | | | | | | |
| 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/> Si la réponse est non, fournir une désignation séparée | | | | | | | | | | | |
| 5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission | | | | | | | | | | | |
| 6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"><thead><tr><th>pays d'origine</th><th>numéro</th><th>date de dépôt</th><th>nature de la demande</th></tr></thead><tbody><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></tbody></table> | | | | pays d'origine | numéro | date de dépôt | nature de la demande | | | | |
| pays d'origine | numéro | date de dépôt | nature de la demande | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| 7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date | | | | | | | | | | | |
| 8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire) DANIELE KERNEIS European Patent & Trademark Attorney | | SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION A. CHAPELAN SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI | | | | | | | | | |

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9910378

TITRE DE L'INVENTION :

Oligonucléotide Immunostimulant

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

: BACHY Monique
Domaine de la Roche
F - 69440 Saint MAURICE sur DARGOIRE

SODOYER Régis
La Calmeraie
5, rue du Brulet
F - 69110 Sainte FOY les LYON

TRANNOY Emanuelle
4, rue Pauline Marie Jaricot
F - 69005 LYON

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

5 août 1999



KERNEIS Danièle

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

| PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN | | | R.M.* | DATE DE LA CORRESPONDANCE | TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR |
|--|--------------|------------|-------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Modifiée(s) | Supprimée(s) | Ajoutée(s) | | | |
| p. 2 | | | | 21.03.00 | 29 MARS 2000 - V D |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

OLIGONUCLEOTIDE IMMUNOSTIMULANT

La présente invention est relative au domaine des immunostimulants. Plus particulièrement, l'invention concerne des oligonucléotides capables de stimuler des cellules humaines intervenant dans le système immunitaire, et à leur utilisation comme adjuvant vaccinal.

Un grand nombre d'oligonucléotides ont déjà été décrits dans l'art antérieur, en relation avec leurs propriétés immunostimulantes. Ainsi, la demande EP 0 468 520 décrit des polynucléotides immunostimulants constitués par un simple brin d'ADN linéaire comprenant de 10 à 100 nucléotides s'enchaînant selon une séquence palindromique.

Selon la demande WO 96/02 555, l'activité immunostimulatrice d'oligonucléotides est liée à la présence d'une séquence dinucléotique 5' CG 3', dans laquelle ni C ni G ne sont méthylés, l'activité immunostimulante étant plus forte si le motif CG est précédé en 5' du dinucléotide GA et / ou suivi en 3' du dinucléotide TC ou encore TT.

Au contraire, selon la demande de brevet WO 98/52 962, il n'est pas nécessaire que la séquence de l'oligonucléotide soit un palindrome, ni qu'elle comprenne le dinucléotide CG ; en effet, les 3 nucléotides décrits dans cette demande pour une utilisation en tant qu'adjuvant vaccinal ont les séquences suivantes : 5' GACGTT 3', 5' GAGCTT 3', ainsi que 5' TCCGGA 3'.

Selon le brevet US 5,663,153, l'activité immunostimulante d'oligonucléotides n'est pas liée à la séquence des nucléotides, mais à la nature de la liaison entre nucléotides, la présence d'au moins une liaison phosphorothioate permettant d'induire une stimulation du système immunitaire.

La plupart des tests de l'art antérieur pour évaluer l'activité immunostimulante des oligonucléotides proposés, sont effectués soit in vitro sur des cellules

5

10

15

20

25

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que le motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété au moins 1 fois.

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est
30 caractérisé en ce que le motif motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété 2 fois.

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que les motifs répétés 5' T T N₁ N₂ T T 3' sont séparés par un nucléotide N₃ qui peut être à chaque fois identique ou différent et qui peut représenter A, C, T ou G.

5

Selon une caractéristique particulière, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que le nucléotide N₃ séparant les 2 premiers motifs T T N₁ N₂ T T lus lorsque la séquence est orientée 5'→3' représente la Cytosine.

- 10 Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend la séquence 5' TTAGTTCTTAGTTN₃TTAGTT 3', dans laquelle A représente l'Adénine, T la Thymine, G la Guanine, et C la Cytosine, et dans laquelle N₃ peut signifier A, T, C ou G.

- 15 Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'induire la prolifération des lymphocytes humains.

- Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'accroître l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD86 des
20 lymphocytes B humains.

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'induire la sécrétion de cytokines, en particulier l'IL 10 et l'Interféron γ .

- 25 L'invention a également pour objet un adjuvant vaccinal caractérisé en ce qu'il comprend au moins un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire possédant au moins une séquence 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T est la Thymine et, N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, l'oligonucléotide
30 étant dépourvu de séquence dinucléotidique CG dans laquelle la Cytosine C ne serait pas méthylée.

L'invention a également pour objet une composition vaccinale à usage humain comprenant au moins un antigène vaccinal caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire possédant au moins une séquence

5 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T signifie Thymine et, N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, l'oligonucléotide étant dépourvu de séquence dinucléotidique CG dans laquelle la Cytosine C ne serait pas méthylée.

10 La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, en référence aux figures 1 à 11 qui illustrent les résultats obtenus lors des tests décrits aux exemples 2 à 7.

En particulier, les Figures 1 et 2 indiquent le nombre de Coups par Minutes obtenus dans le test de l'Exemple .

15 Les Figures 3 et 5 indiquent le pourcentage de cellules CD20+ exprimant le marqueur CD25, pour les oligonucléotides obtenus selon l'exemple 1. De même, les Figures 4 et 6 indiquent le pourcentage de cellules CD20+ exprimant le marqueur CD86.

20 La Figure 7 indique le nombre de Coups par Minute obtenus dans le test de l'exemple 4.

La Figure 8 indique le pourcentage de cellules CD20+ exprimant le marqueur CD25, pour les oligonucléotides obtenus selon l'exemple 4. De même, la Figure 9 indique le pourcentage de cellules CD20+ exprimant le marqueur CD86.

25 La Figure 10 indique le nombre de spots mesurés pour la sécrétion d'Interféron γ par des cellules stimulées en présence des oligonucléotides ayant les séquences 9 à 12 décrites à l' Exemple 4.

La Figure 11 indique le nombre de spots mesurés pour la sécrétion d'IL10 par des cellules stimulées en présence des oligonucléotides ayant les séquences 9
30 à 12 décrites à l' Exemple4.

Par oligonucléotide au sens de la présente invention, on entend un polynucléotide comprenant au moins 6 nucléotides. En effet, contrairement à l'enseignement de l'article intitulé "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation", Krieg et al., Nature 1995, on a remarqué qu'il n'était pas
5 nécessaire que l'oligonucléotide ait au moins 8 nucléotides. Par contre, la limite supérieure de la taille des oligonucléotides n'est pas vraiment déterminée. On peut cependant noter que, plus l'oligonucléotide sera long, plus sa purification sera difficile à effectuer lors des étapes de synthèse, et plus le prix de revient en sera élevé. D'autre part, il est probable qu'un
10 oligonucléotide de grande longueur aura plus de difficultés à pénétrer dans les cellules. Aussi, pour les besoins de la présente invention, on considère qu'une limitation de la taille de l'oligonucléotide à 100 nucléotides est appropriée. Cet oligonucléotide est de préférence un oligonucléotide simple brin; il peut s'agir d'un oligodésoxyribonucléotide ou d'un oligoribonucléotide. On a obtenu de
15 particulièrement bons résultats en utilisant un oligodésoxyribonucléotide. Les oligonucléotides convenant aux fins de l'invention peuvent se présenter sous forme de phosphodiester ou, afin d'être plus stables, sous forme de phosphorothioates ou d'hybrides phosphodiester / phosphorothioates. Les oligonucléotides phosphorothioates sont ceux préférés.

20

L'oligonucléotide selon l'invention est capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire. Cette stimulation est appréciée notamment par la lymphoprolifération ou par l'expression de marqueurs d'activation, tels que les marqueurs CD25 et CD86 des lymphocytes B. Il est possible de
25 sélectionner les oligonucléotides d'intérêt au moyen de tests différents de ceux proposés dans la présente demande, à condition cependant qu'il s'agisse de tests évaluant la capacité de stimulation de cellules humaines, et non pas comme dans la plupart des documents de l'art antérieur, de tests évaluant la capacité de la stimulation de cellules murines. Il serait notamment possible de
30 tester l'expression d'autres marqueurs d'activation des lymphocytes B tels que les marqueurs CD69 ou CD56, ou l'expression de marqueurs de prolifération tels que le marqueur KI67; des tests relatifs à l'augmentation des marqueurs

d'activation et de maturation des cellules dendritiques pourraient également être utilisés. De même, des tests permettant l'appréciation de l'augmentation de production de certaines cytokines telles que par exemple IL6, IL12, IL10, IFN γ , TNF α . peuvent également être utilisés.

5

Selon une caractéristique de l'invention, l'oligonucléotide comprend au moins une séquence nucléotidique 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T signifie Thymine et, N₁ et N₂ peuvent représenter chacun l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine. Cette formule couvre ainsi 16 possibilités. Cette
10 séquence peut être 5' terminale, 3' terminale ou être entourée par d'autres nucléotides. Elle peut être unique ou répétée plusieurs fois à l'identique à l'intérieur d'un même oligonucléotide. Un oligonucléotide selon l'invention peut également comprendre plusieurs séquences différentes correspondant chacune au motif 5' T T N₁ N₂ T T 3'.

15

Selon l'invention, l'oligonucléotide ne comporte pas de séquence palindromique. Malgré cette absence de séquence palindromique, un tel oligonucléotide est capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire.

20

Selon une caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine n'est pas méthylée. Cette exclusion s'applique également au motif N₁N₂. La capacité des oligonucléotides de l'art antérieur à être immunostimulants a presque toujours été interprétée comme
25 liée à la présence de motifs CpG non méthylés (Cf. notamment l'article de Krieg et al dans Nature d'avril 1995 cité ci-dessus), cette interprétation étant en cohérence avec l'observation selon laquelle la fréquence de ce dinucléotide était 4 fois plus importante dans le génome des bactéries et des virus que dans celui des vertébrés. De façon surprenante, on a maintenant trouvé que des
30 oligonucléotides entièrement dépourvus de ce motif dinucléotidique étaient cependant parfaitement capables de stimuler le système immunitaire humain.

Selon un mode particulier de réalisation de la présente invention, le motif N_1N_2 correspond au dinucléotide AG, dans lequel A signifie Adénine et G signifie Guanine.

Selon une caractéristique avantageuse, le motif 5' TTAGTT 3' est répété au moins une fois dans l'oligonucléotide, et de préférence au moins 2 fois. De préférence encore, les motifs répétés sont séparés par au moins un nucléotide N_3 , qui représente l'Adénine, la Cytosine, la Guanine ou la Thymine. A l'intérieur d'un oligonucléotide, ce nucléotide de séparation peut être toujours le même, ou être différent à chaque fois. De préférence, le nucléotide séparant les 2 premiers motifs TTAGTT de l'oligonucléotide, (lorsque l'on considère le sens de lecture 5'→3') est constitué par la Cytosine.

De façon particulière, les oligonucléotides dont les séquences nucléotidiques répondent à la formule 5' TTAGTTCTTAGTT N_3 TTAGTT 3', dans laquelle N_3 représente A, T, C ou G, sont ceux préférés au sens de la présente invention.

Selon une caractéristique particulière, l'oligonucléotide selon l'invention est dépourvu ou appauvri en séquence nucléotidique capable d'inhiber les cellules du système immunitaire humain. En effet, afin d'obtenir un effet global immunostimulant, si des motifs inhibiteurs ou neutralisants tels que, par exemple, ceux décrits dans la demande WO 98/52 581 sont présents, il faut que leur effet soit supprimé ou réduit, grâce à la présence d'une séquence à effet immunostimulant plus prononcé, ou grâce à la présence d'un plus grand nombre de séquences

5' T T N_1 N_2 T T 3'.

La présente invention a également pour objet un adjuvant vaccinal comprenant au moins un oligonucléotide immunostimulant ayant au moins un motif 5' T T N_1 N_2 T T 3' tel que mentionné ci-dessus. Par adjuvant vaccinal, on entend un produit qui permet d'accroître ou de modifier la réponse du système immunitaire d'un organisme vis à vis de l'administration d'un antigène. En particulier, il peut s'agir d'une augmentation de la réponse humorale ou de la réponse cellulaire.

L'action d'un adjuvant vaccinal peut également être, non pas une augmentation de la réponse qui se produirait en l'absence d'adjuvant, mais une orientation différente de la réponse produite : par exemple, orientation vers une réponse cellulaire plutôt qu'une réponse humorale, production de certaines cytokines
5 plutôt que d'autres, production de certains types ou sous-types d'anticorps plutôt que d'autres, stimulation de certaines cellules plutôt que d'autres, etc...

L'oligonucléotide immunostimulant de la présente invention peut être utilisé comme adjuvant vaccinal quelle que soit la nature de l'antigène administré et
10 quel que soit le nombre de valences utilisées. Il peut être le seul adjuvant utilisé ou, au contraire, être un élément d'une combinaison adjuvante.

L'action adjuvante de l'oligonucléotide selon l'invention peut être obtenue, soit lorsqu'il est associé à l'antigène ou aux antigènes lors de leur administration, i.e. lorsqu'ils font partie de la même composition vaccinale, soit lorsqu'il est
15 administré séparément de l'antigène ou des antigènes. On préfère cependant l'utiliser dans la même composition vaccinale que l'antigène ou les antigènes à administrer.

L'oligonucléotide selon l'invention peut avantageusement être administré par toutes les voies susceptibles d'être utilisées pour une composition vaccinale:
20 voie muqueuse ou voie systémique.

L'un des objets de l'invention est une composition vaccinale comprenant au moins un oligonucléotide immunostimulant ayant une séquence
5' T T N₁N₂ T T 3' telle que décrite ci-dessus.

25

Une composition vaccinale selon l'invention peut être destinée à l'immunisation contre une seule maladie, ou destinée à l'immunisation contre plusieurs maladies. Il peut s'agir d'une composition vaccinale liquide ou lyophilisée. Elle peut comprendre, outre les antigènes, tout ou partie des composants
30 habituellement présents dans un vaccin tels que tampons, stabilisants, conservateurs, ...etc. Elle peut également comprendre un ou plusieurs adjuvant(s) autre(s) que ceux objets de la présente invention. Elle peut

également comprendre plusieurs adjuvants objets de la présente invention, constitués soit par des oligonucléotides ayant tous le même motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' mais se différenciant par les nucléotides en 5' et/ou en 3', soit par des oligonucléotides ayant des motifs 5' T T N₁ N₂ T T 3' différents, dont
5 les séquences en 5' et en 3' sont identiques ou différentes.

La composition vaccinale selon l'invention peut être destinée à une administration prophylactique ou à une administration thérapeutique.

10 La composition vaccinale selon l'invention peut être formulée de manière à optimiser l'action adjuvante de l'oligonucléotide objet de l'invention. Ainsi, l'oligonucléotide peut être couplé à un lipide, tel que le cholestérol ; il peut être intégré dans une émulsion de type huile / eau ou formulé sous forme de liposomes.

15 Les exemples qui suivent illustrent des modes de réalisation particuliers de la présente invention.

20 Exemple 1 : Synthèse des oligonucléotides

On synthétise 15 oligonucléotides ayant chacun un des motifs suivants :

| | | |
|--------------|---|---------|
| 5' TTAATT 3' | } | Série A |
| 5' TTACTT 3' | | |
| 5' TTATTT 3' | | |
| 5' TTAGTT 3' | | |
| 5' TTTTTT 3' | } | Série T |
| 5' TTTATT 3' | | |
| 5' TTTCTT 3' | | |
| 5' TTTGTT 3' | | |

5' TTCCTT 3' }
5' TTCATT 3' } Série C
5' TTCTTT 3' }

5' TTGGTT 3' }
5' TTGATT 3' } Série G
5' TTGTTT 3' }
5' TTGCTT 3' }

Et ayant 4 Adénine en 5' et 5 Adénine en 3'.

La synthèse de ces oligonucléotides est réalisée au moyen d'un automate
5 synthétiseur fourni par Applied Biosystems qui met en œuvre la méthode
chimique standard au phosphoramidite et qui comporte à chaque cycle une
étape d'oxydation, qui est réalisée au moyen d'une solution tétraéthylthiuram /
acétonitrile pour obtenir une liaison phosphorothioate.

10 On prépare en outre, de la même façon, un oligonucléotide A15(S) qui ne
comprend que des A et qui est phosphorothioate sur toute sa longueur. Cet
oligonucléotide est un témoin négatif car il n'entraîne ni prolifération ni
augmentation de l'expression des marqueurs d'activation des lymphocytes B.

15 On prépare également un oligonucléotide 3Db(S) dont la séquence est
identifiée dans la demande de brevet WO96/02555 sous SEQ ID N°15
(5'GAGAACGCTCGACCTTCGAT3'); cet oligonucléotide comporte des
liaisons phosphorothioates sur toute sa longueur et est utilisé comme témoin
positif.

20

Tous les oligonucléotides sont maintenus en solution dans du tampon PBS.

Exemple 2 : Test de Lymphoprolifération

On isole des lymphocytes à partir du sang périphérique d'un donneur, en procédant à une centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ces lymphocytes sont ajustés à $2 \cdot 10^6$ cellules / ml dans du milieu de culture (RPMI 1640 + 10% de Sérum de Veau Foetal ainsi que de la Glutamine, de la Streptomycine et de la Pénicilline).

Les cellules sont distribuées en plaques 96 puits (fond rond) sous 100 μ l, soit $2 \cdot 10^5$ cellules par puits. On ajoute ensuite 100 μ l d'une solution 4 μ M d'oligonucléotides à tester produites à l'exemple 1 (1 seul type d'oligonucléotide par puits) afin d'obtenir une concentration finale 2 μ M.

Les cellules sont incubées pendant 48 à 72 heures.

La Thymidine tritiée (Amersham TRK 120) est diluée dans du milieu de culture puis distribuée dans les plaques à raison de 1 μ Ci par puits sous 50 μ l. Après 7 à 8 heures d'incubation à l'étuve (5% CO₂, 37°C), les plaques peuvent être congelées à -80°C et traitées plus tard.

A l'aide du "Harvester", on récolte le contenu des puits sur des plaques Unifilter GF/C et on réalise 6 lavages en eau distillée puis un lavage en éthanol 70% afin de précipiter l'ADN.

Après séchage des plaques, 25 μ l de liquide scintillant (Microscint-40, Packard) sont distribués dans chaque puits et permettent de quantifier la radioactivité (rayonnements émis par le tritium) en mesurant le nombre de coups / minute (cpm) émis par chaque puits sur le compteur Top Count (Packard).

Les résultats obtenus pour chacun des oligonucléotides testés sont représentés sur les figures 1 et 2, qui indiquent, pour chaque oligonucléotide testé le nombre de coups par minute; on remarque que tous les

oligonucléotides selon l'invention ont un résultat nettement supérieur au résultat obtenu avec le milieu seul ou le témoin négatif A15(S), ce qui signifie qu'ils sont tous capables de stimuler la prolifération des lymphocytes.

5

Exemple 3 :

Test relatif aux marqueurs d'activation

- 10 Le test est effectué à partir de lymphocytes isolés d'un donneur comme décrit à l'exemple précédent, et ajustés à 2.10^6 cellules/ml dans le même milieu de culture.

Les cellules sont ensuite distribuées en plaques 12 puits sous un volume de 2 ml, soit 4.10^6 cellules / puits. On ajoute dans chaque puits une quantité d'oligonucléotides à tester préparées à l'exemple 1 (1 oligonucléotide / puits) suffisante pour obtenir une concentration en oligonucléotide 2 μ M. Puis les cellules sont incubées pendant 72 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite doublement marquées au moyen de CD25PE / CD20FITC ou CD86PE / CD20FITC puis analysées sur FACScan. Les résultats obtenus sont illustrés sur les figures 3, 4, 5 et 6 qui représentent pour chaque oligonucléotide testé, le pourcentage de cellules B (CD20+) qui expriment le marqueur CD25 (celles qui sont CD25+) ou le marqueur CD86 (celles qui sont CD86+). Les résultats représentés sur les figures 3 et 4 ont été obtenus lors d'un test réalisé à un moment différent du test dont les résultats sont illustrés sur les figures 5 et 6, ce qui explique la différence d'ordre de grandeur du nombre de coups par minute mesuré. En effet, dans ce genre de manipulations, les tests sont très variables d'un dosage à l'autre, seule la comparaison des différents résultats obtenus lors d'un même test sont comparables entre eux, d'où la nécessité d'inclure lors de chaque test, un oligonucléotide-témoin ainsi qu'un dosage du milieu seul.

15

20

25

30

On remarque que tous les oligonucléotides objets de l'invention activent les lymphocytes B qui expriment leur marqueur d'activation CD25 et CD86.

5 Exemple 4 :

On prépare, de la même manière qu'à l'exemple 1, une série de 16 oligonucléotides dont les séquences sont les suivantes:

- 10 Seq Id 1 : 5' TTAGTTATTAGTTATTAGTT 3'
- Seq Id 2 : 5' TTAGTTATTAGTTTTTAGTT 3'
- Seq Id 3 : 5' TTAGTTATTAGTTCCTAGTT 3'
- Seq Id 4 : 5' TTAGTTATTAGTTGTTAGTT 3'
- Seq Id 5 : 5' TTAGTTTTTAGTTATTAGTT 3'
- 15 Seq Id 6 : 5' TTAGTTTTTAGTTTTTAGTT 3'
- Seq Id 7 : 5' TTAGTTTTTAGTTCCTAGTT 3'
- Seq Id 8 : 5' TTAGTTTTTAGTTGTTAGTT 3'
- Seq Id 9 : 5' TTAGTTCCTAGTTATTAGTT 3'
- Seq Id 10 : 5' TTAGTTCCTAGTTTTTAGTT 3'
- 20 Seq Id 11 : 5' TTAGTTCCTAGTTCCTAGTT 3'
- Seq Id 12 : 5' TTAGTTCCTAGTTGTTAGTT 3'
- Seq Id 13 : 5' TTAGTTGTTAGTTATTAGTT 3'
- Seq Id 14 : 5' TTAGTTGTTAGTTTTTAGTT 3'
- Seq Id 15 : 5' TTAGTTGTTAGTTCCTAGTT 3'
- 25 Seq Id 16 : 5' TTAGTTGTTAGTTGTTAGTT 3'

Ces oligonucléotides sont de type phosphorothiate sur toute leur longueur.

Exemple 5 :

On évalue la capacité qu'ont les oligonucléotides préparés à l'exemple 4 d'induire la prolifération des lymphocytes humains grâce à un test de lymphoprolifération tel que celui décrit à l'exemple 2. De la même façon qu'à l'exemple 2, la concentration en oligonucléotide par puits est 2µM, et les témoins sont constitués par le milieu seul, l'oligonucléotide A15(S) ainsi que l'oligonucléotide 3Db(S).

Les résultats obtenus, exprimés en Coups par Minute, sont représentés à la Figure 7 qui montre que tous les oligonucléotides selon l'invention sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes et que de particulièrement bons résultats sont obtenus lorsque les séquences des oligonucléotides sont celles identifiées par les Seq Id 9 à 12, i.e. lorsque la Cytosine sépare les 2 premiers motifs TTN₁N₂TT de l'oligonucléotide.

15

Exemple 6 :

On évalue la capacité qu'ont les oligonucléotides préparés à l'exemple 4 d'induire l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD86 des lymphocytes B. Cette évaluation est effectuée grâce au test décrit à l'exemple 3. Les résultats obtenus avec les oligonucléotides préparés selon l'exemple 4 sont représentés sur les Figures 8 et 9 qui illustrent les pourcentages de cellules B (CD20+) qui expriment également le marqueur CD25 (Figure 8) ou le marqueur CD86 (Figure 9).

Les résultats obtenus dans ce test confirment ceux obtenus dans le test de lymphoprolifération: tous les oligonucléotides selon l'invention induisent l'expression de marqueurs d'activation des lymphocytes B humains; de particulièrement bons résultats sont obtenus lorsque les 2 premiers motifs TTN₁N₂TT de l'oligonucléotide sont séparés par une Cytosine.

30

Exemple 7 :

On évalue la capacité qu'ont les oligonucléotides selon la présente invention à induire la sécrétion de cytokines.

- 5 Pour cette évaluation, on isole des lymphocytes à partir du sang périphérique d'un donneur, en procédant à une centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ces lymphocytes sont ajustés à $2 \cdot 10^6$ cellules / ml dans du milieu de culture (milieu AIM V + streptomycine + penicilline).

- 10 Les plaques 96 puits ELISPOT (fond plat en nitrocellulose) sont pré-incubées la veille avec une solution d'anticorps de capture de cytokines (IL-10 ou IFN γ suivant le test réalisé), puis saturées avec du milieu de culture.

- On distribue ensuite 100 μ l de cellules dans les plaques ELISPOT, soit $2 \cdot 10^5$ cellules par puits, puis on ajoute 100 μ l d'une solution 4 μ M en oligonucléotides à tester, produits selon l'exemple 4 (1 seul type d'oligonucléotide par puits) afin
15 d'obtenir une concentration finale 2 μ M. Le test est réalisé avec les oligonucléotides ayant les séquences décrites sous Seq Id 9, Seq Id 10, Seq Id 11 et Seq Id 12.

- Les plaques sont incubées à 37°C, sous atmosphère à 5% de CO $_2$. Au bout de
20 72 heures d'incubation, les cellules sont éliminées par lavage en présence de détergent (Tween 1%) et les cytokines fixées sur les anticorps de capture sont révélées par l'addition successive d'anticorps de détection biotynylés (anti-IL-10 ou anti-IFN γ suivant le test réalisé), de streptavidine-HRP, et du substrat AEC.

25

Les spots (1 spot correspondant à 1 cellule sécrétrice de cytokine) sont compté à l'aide d'un compteur automatique. Les résultats sont exprimés en nombre de spots (nombre de cellules sécrétrices) par million de cellules.

- 30 Les résultats obtenus pour chacun des oligonucléotides testés sont représentés sur les figures 10 et 11, qui indiquent, pour chaque oligonucléotide testé le nombre de cellules sécrétrices de cytokines par million de cellules

totales ; on remarque que tous les oligonucléotides selon l'invention ont un résultat nettement supérieur au résultat obtenu avec le milieu seul ou le témoin négatif A15(S), ce qui signifie qu'ils sont tous capables d'induire la sécrétion de cytokines, notamment d'IL 10 et d'Interféron γ .

LISTE DE SEQUENCES

<110> PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS

5 <120> OLIGONUCLEOTIDE IMMUNOSTIMULANT

<130> PM9908FR

<140>

10 <141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

20

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide

<400> 1

ttagttatta gttattagtt

20

25

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

30

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide

<400> 2

35

ttagttatta gtttttagtt

20

<210> 3

<211> 20

40

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide

45

<400> 3

ttagttatta gttcttagtt

20

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 4
10 ttagttatta gttgtagtt 20

<210> 5
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
20 <400> 5
ttagtttta gttattagtt 20

<210> 6
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
30 <400> 6
ttagtttta gttttagtt 20

<210> 7
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
40 <223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 7
ttagtttta gttcttagtt 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 8
10 ttagttttta gttgtagtt 20

<210> 9
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
20 <400> 9
ttagttctta gttattagtt 20

<210> 10
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
30 <400> 10
ttagttctta gtttttagtt 20

35 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
40 <223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 11
ttagttctta gttcttagtt 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 12
10 ttagttctta gttgtagtt 20

<210> 13
<211> 20
15 <212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
20 <400> 13
ttagttgta gttattagtt 20

<210> 14
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
30 <400> 14
ttagttgta gtttttagtt 20

<210> 15
35 <211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle
<220>
40 <223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide
<400> 15
ttagttgta gttcttagtt 20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
oligonucleotide

<400> 16

10 ttagttgta gttgtagtt

20

Revendications

1. Oligonucléotide immunostimulant , caractérisé en ce qu'il comprend au
5 moins une séquence nucléotidique ayant la formule suivante 5' T T N₁ N₂
T T 3', dans laquelle T signifie Thymine, N₁ et N₂ peuvent chacun
représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, et en ce qu'il
est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C ne serait pas
méthylée.
- 10 2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend
de 6 à 100 nucléotides.
3. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce que N₁
15 représente l'Adénine et en ce que N₂ représente la Guanine.
4. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en
ce que le motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété au moins 1 fois.
- 20 5. Oligonucléotide selon la revendication précédente caractérisé en ce que le
motif motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété 2 fois.
6. Oligonucléotide selon une des revendications 4 et 5, caractérisé en ce que
les motifs répétés 5' T T N₁ N₂ T T 3' sont séparés par un nucléotide N₃ qui
25 peut être à chaque fois identique ou différent et qui peut représenter A, C, T
ou G.
7. Oligonucléotide selon la revendication précédente, caractérisée en ce que
le nucléotide N₃ séparant les 2 premiers motifs T T N₁ N₂ T T lus lorsque la
30 séquence est orientée 5'→3' représente la Cytosine.

8. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'il comprend la séquence 5' TTAGTTCTTAGTTN₃TTAGTT 3', dans laquelle A représente l'Adénine, T la Thymine, G la Guanine, et C la Cytosine, et dans laquelle N₃ peut signifier A, T, C ou G.
5
9. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la prolifération des lymphocytes humains.
10. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la sécrétion de cytokines.
10
11. Oligonucléotide selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la sécrétion d'IL 10.
15
12. Oligonucléotide selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la sécrétion d'Interféron γ .
13. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'accroître l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD86 des lymphocytes B humains.
20
14. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications précédentes pour la fabrication d'un médicament.
25
15. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un immunostimulant humain.
16. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'un adjuvant vaccinal.
30

17. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 10, pour la fabrication d'une composition vaccinale.
- 5 18. Composition vaccinale à usage humain, comprenant au moins un antigène vaccinal, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 10

animales (essentiellement des cellules murines), soit in vivo sur des souris. Cependant, les différences existant entre le système immunitaire de la souris et celui de l'être humain, ont conduit à des différences entre les résultats obtenus sur des cellules murines et ceux obtenus sur des cellules humaines.

5

Or l'industrie pharmaceutique a un grand besoin d'immunostimulants pouvant être administrés à l'homme, notamment dans le domaine des vaccins.

La présente invention a donc pour but de proposer des oligonucléotides capables de stimuler des cellules du système immunitaire de l'être humain.

10

Pour atteindre ce but, l'invention a pour objet un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence 5' T T N₁ N₂ T T 3' dans laquelle T est la

15 Thymine, et N₁ et N₂ peuvent chacun représenter l'Adénine, la Thymine, la Cytosine ou la Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C n'est pas méthylée.

15

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel oligonucléotide pour la fabrication d'un médicament.

20

Selon une caractéristique de l'invention, l'oligonucléotide comprend de 6 à 100 nucléotides.

25 Selon une caractéristique particulière, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que N₁ représente l'Adénine et en ce que N₂ représente la Guanine.

25

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que le motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété au moins 1 fois.

30

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que le motif 5' T T N₁ N₂ T T 3' est répété 2 fois.

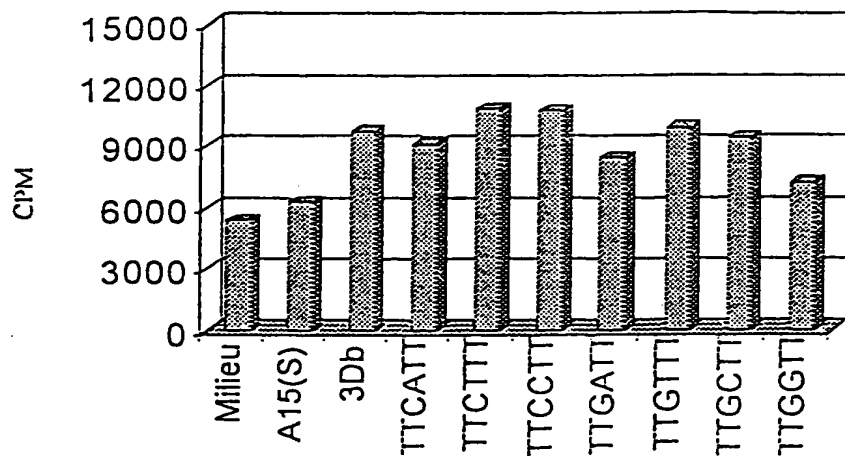


Figure 1

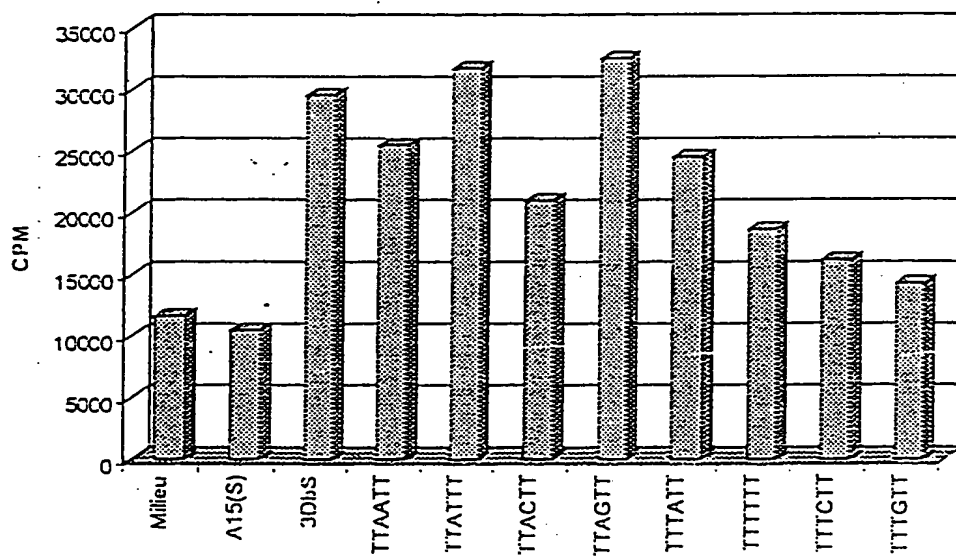


Figure 2

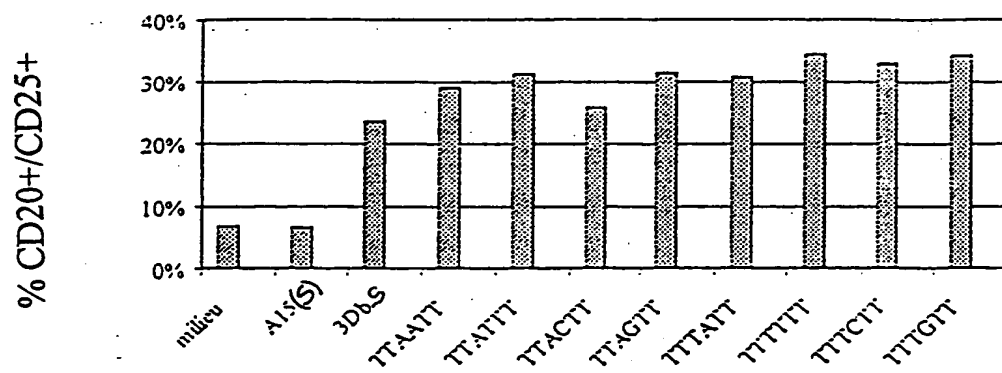


Figure 3

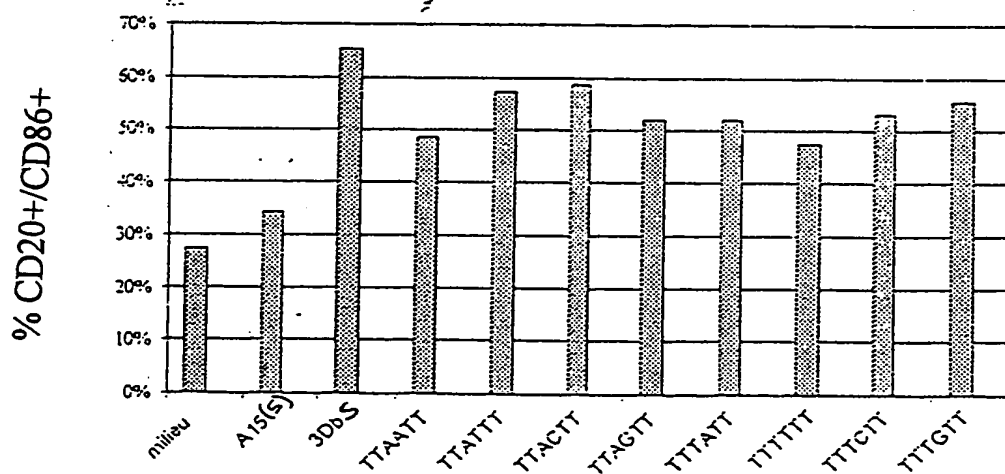


Figure 4

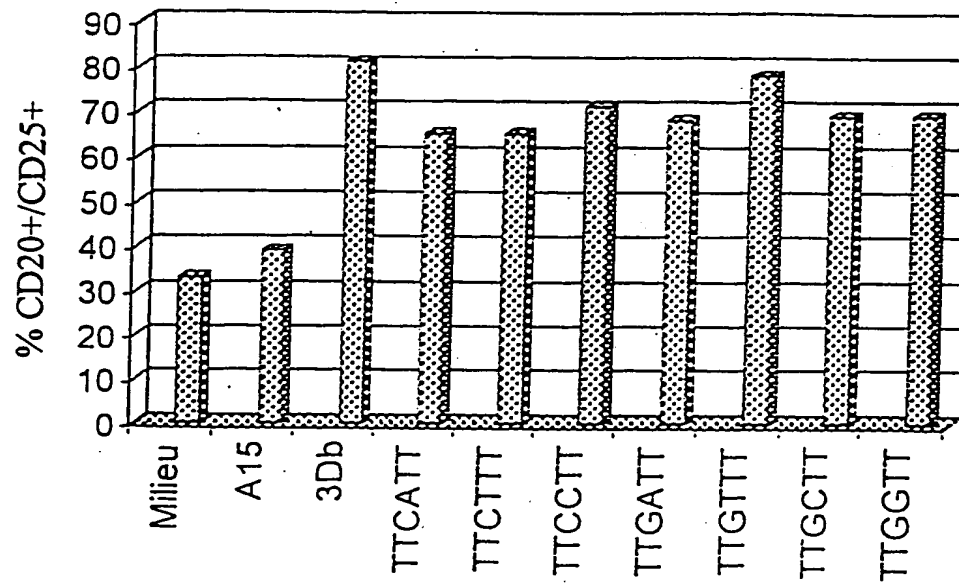


Figure 5

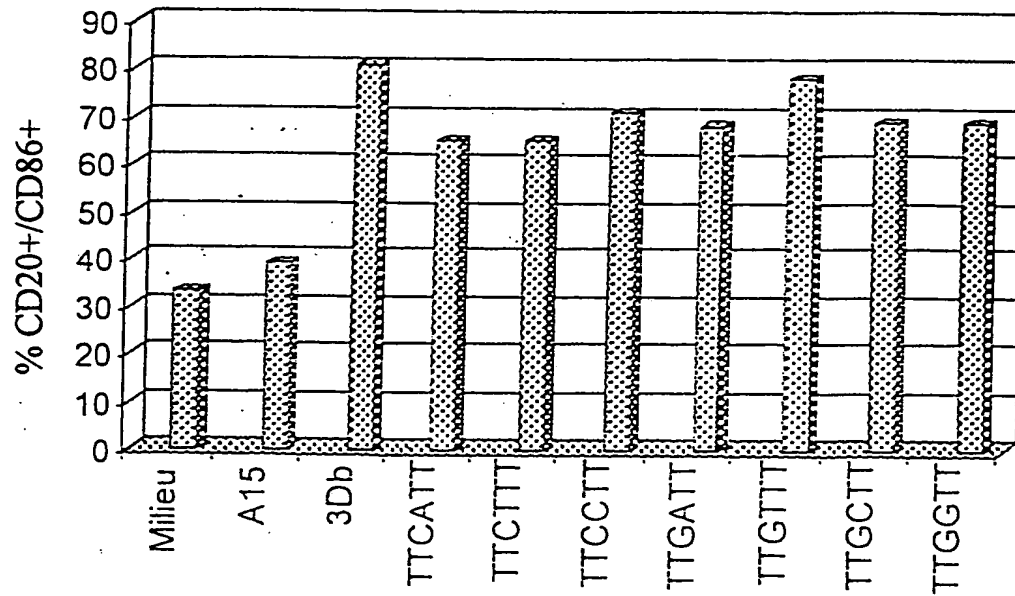


Figure 6

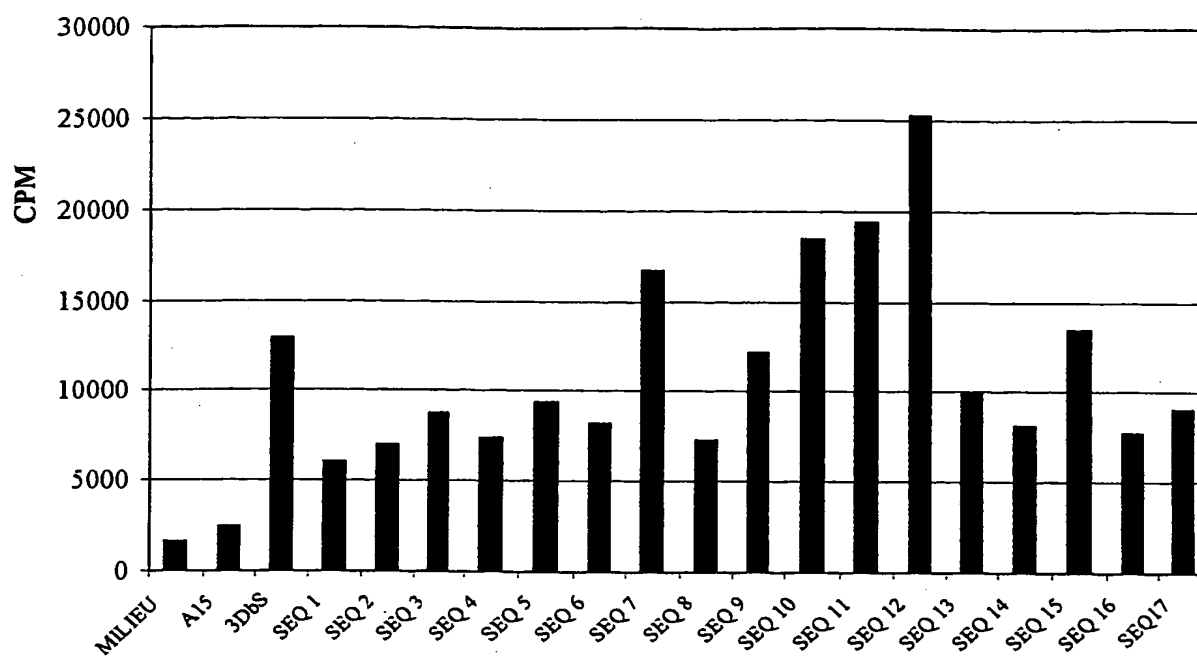


Figure 7

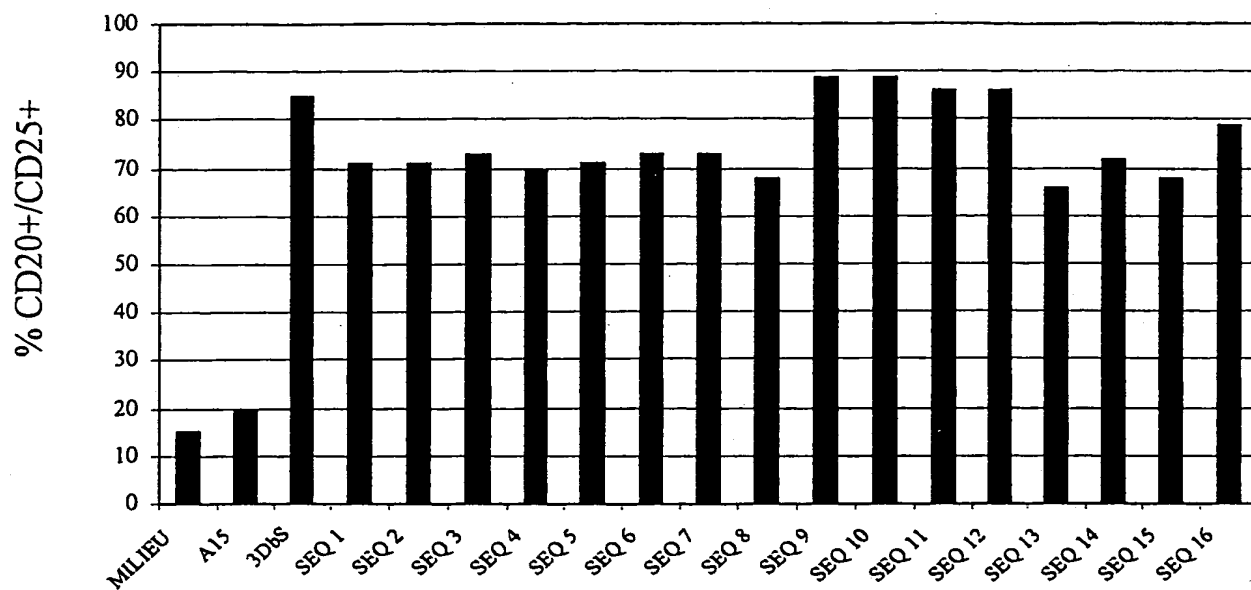


Figure 8

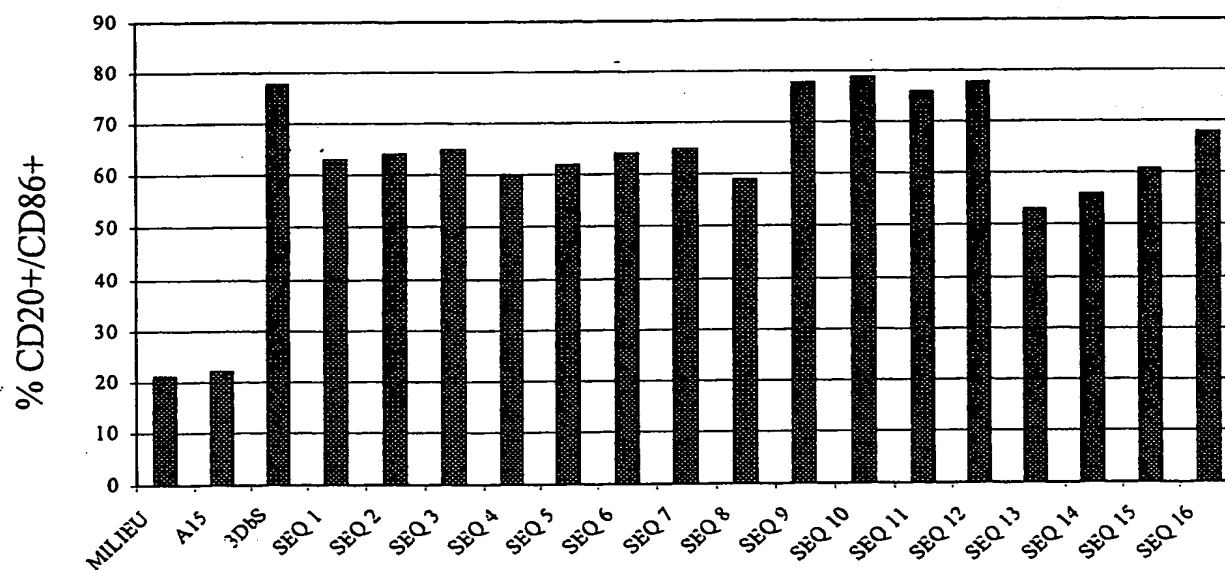


Figure 9

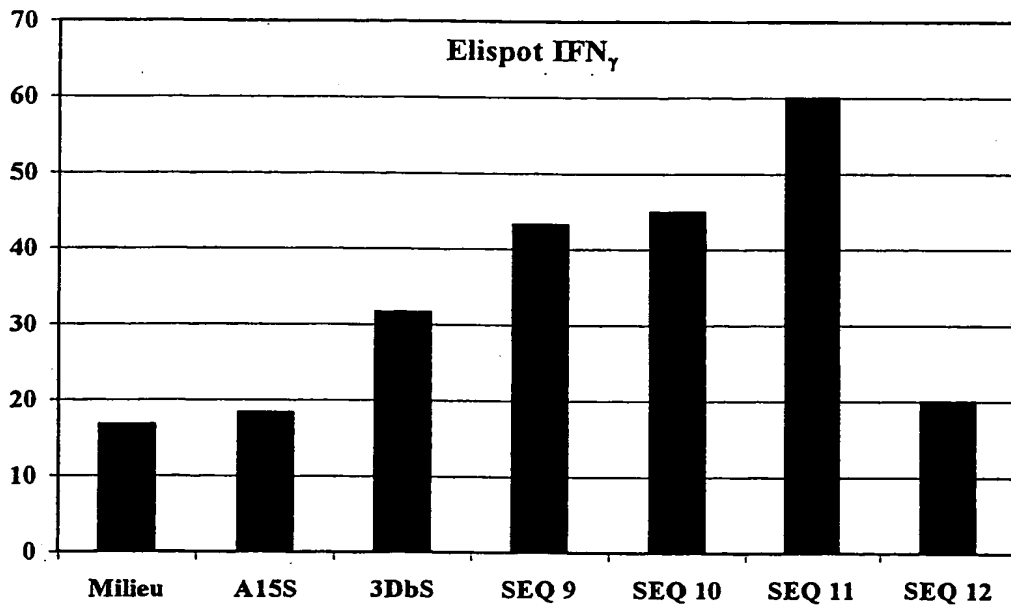


Figure 10

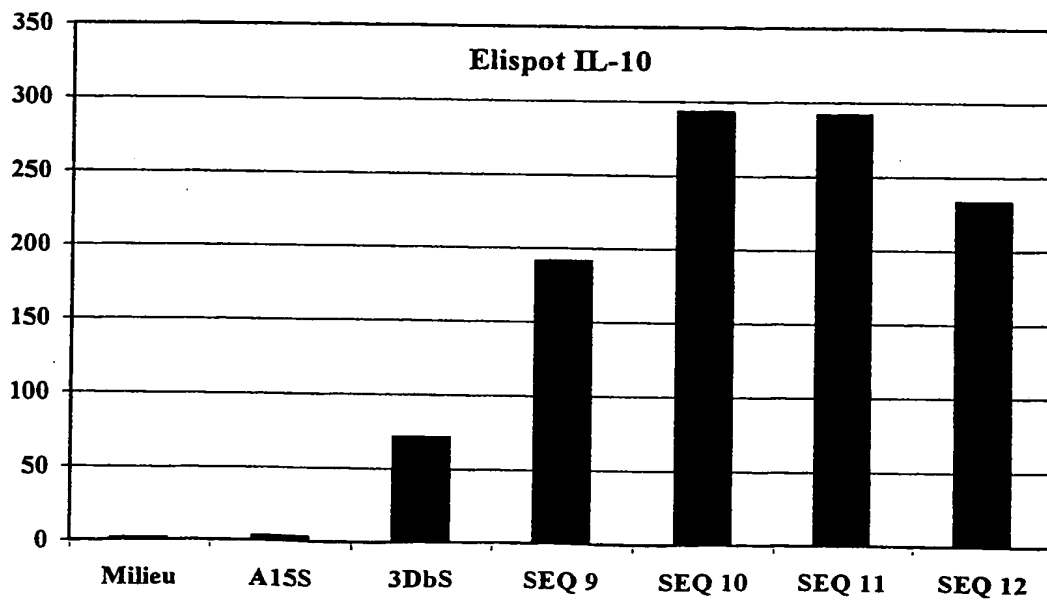


Figure 11